UNIVERSITÀ DI PISA
ISTITUTO DI PATOLOGIA VEGETALE
E DI MICROBIOLOGIA AGRARIA E TECNICA
OSSERVATORIO REGIONALE DI FITOPATOLOGIA

221

O. VERONA - G. FLORENZANO

Su di una nuova specie di Brettanomyces isolata da uva

Estratto dai « Rendiconti dell'Accademia Nazionale dei Lincei »
(Classe di Scienze fisiche, matematiche e naturali)
serie VIII, vol. III, fasc. 3-4)

COMMONWEALTH MYCOLOGICAL INSTITUTE
24 AUG 1948

Dai «Rendiconti dell'Accademia Nazionale dei Lincei»
(Classe di Scienze fisiche, matematiche e naturali)
serie VIII, vol. III, fasc. 3-4

Botanica. — *Su di una nuova specie di Brettanomyces isolata da uva.* Nota [*] di O. VERONA e G. FLORENZANO, presentata dal Socio A. CHIARUGI.

Durante il corso di ricerche eseguite sulla microflora delle uve di zone perichiantigiane ci è stata offerta l'occasione di isolare un lievito anascosporeo che lo studio sistematico ha permesso di riferire al genere *Brettanomyces*.

Questo genere, com'è noto, fu definito da Kufferath e van Laer nel 1921 [1] per alcuni lieviti isolati dal «lambic» e da birre inglesi. Nel frattempo esso fu piuttosto trascurato e da taluno, anzi, ritenuto o supposto sinonimo di altri generi. Tuttavia, in epoca recente, è stato riconvalidato da Custers [2] ed accettato, nella loro revisione monografica dei lieviti anascosporei, da Diddens e Lodder [3].

(*) Pervenuta all'Accademia il 5 agosto 1947.

(1) H. KUFFERATH e M. H. VAN LAER, « Bull. Soc. Chim. Belgique », vol. 30, p. 270, 1921.

(2) M. T. J. CUSTERS, *Onderzoekingen over het Gistgeslacht « Brettanomyces »*. Delft, 1940.

(3) H. A. DIDDENS e J. LODDER, *Die anascosporogen Hefen* (II parte). Amsterdam, 1942.

La specie isolata presenta i seguenti caratteri fondamentali [4]:

CARATTERI COLTURALI E MICROMORFOLOGICI. – Su agar–malto si hanno patine non abbondanti, poco dense, dapprima bianche e quindi brunastre, specialmente al centro, umide, lisce, non molto estese. Cellule ovali, spesso riunite in corte catene e cellule piuttosto allungate di μ 2–2.5 × 5–6, frequentemente munite di piccola gemma apicale o sub–laterale.

Su agar–fagiuoli patine più abbondanti, più dense, dapprima bianco–crema, poltacee, lucenti, leggermente rilevate al centro, che diventano di colore marrone con i margini più chiari, continui o lobati. Cellule ovali con grande vacuolo, disposte in catene formanti spesso aggregati pseudoramosi, di μ 2–2.5 × 2.5–5, miste a cellule più allungate o più piccole.

Su agar–Gorodkowa vegetazione scarsamente sviluppata. Aspetto morfologico come in agar–malto e in agar–fagiuoli. Non osservate spore.

Su malto si forma deposito al fondo. Liquido limpido, non anello, non velo. Le cellule del deposito si presentano generalmente ovali e vacuolate, di μ 3 × 5–6, isolate o in catena. Presenza tuttavia di cellule anche allungate di μ 2–2.5 × 5–6.

Su agar–patata patine non molto abbondanti, bianche, lucenti, opache, che divengono brune con il tempo. Aspetto micromorfologico come negli altri agar.

In patata in pezzi sviluppo molto scarso; cellule tendenzialmente allungate, comparsa di rudimentale pseudomicelio. Su blocchetti di carota sviluppo lento ma più abbondante che su patata di patina bianca, lucente, ad orlo lobato e solchi trasversali. Cellule prevalentemente ovali.

CARATTERI BIOCHIMICI. – La specie isolata fermenta, formando gas e acido, glucosio, levulosio, mannosio e saccarosio. Non fermenta maltosio, galattosio, raffinosio, lattosio; produce però scarsa acidità in raffinosio e maltosio.

Delle sorgenti di carbonio assimila i ricordati zuccheri; solo galattosio e lattosio sono molto poco utilizzati. Utilizza anche l'acido malico e tartarico; non sempre l'alcool etilico e la glicerina [5].

Delle sorgenti azotate assimila molto bene peptone ed asparagina; abbastanza bene sono utilizzati anche solfato ammonico e nitrato potassico. Nitriti ed urea non risultano essere assimilati.

Non fluidifica la gelatina.

RIFERIMENTO SISTEMATICO. – Nell'ambito del genere, le specie sicuramente note e ben descritte non sono molte. Custers prima, e Diddens e Lodder

(4) Trapianti di essa, come ormai è uso, sono stati depositati presso il «Centraalbureau voor Schimmelcultures» di Barn–Delft (Olanda).

(5) Per questa prova ci siamo tenuti a quanto fissato in: N. M. STELLING–DEKKER, *Die Sporogenen Hefen*, Amsterdam, 1931 (p. 32): «Die Tauglichkeit von Äthylalkohol als Wachstumssubstrat». Si sono eseguite colture, cioè, in acqua 100, solfato ammonico 0.1, fosfato monopotassico 0.1, solfato di magnesio 0.05 presente il 3 % di alcool etilico.

dopo, ricordano *Brett. anomalus* Custers, *Brett. Claussenii* Custers, *Brett. lambicus* Kuff et v. Laer, *Brett. bruxellensis* Kuff. et v. Laer. Queste specie sono state quasi tutte isolate da « lambic » o da birre. Da uva è stato solo isolato *Brett. bruxellensis*, sotto il nome di *Mycotorula intermedia* (oggi passata in sinonimia) da Krumbholz e Tauschanoff [6], e un *Brett. sp.* se tale si vuol considerare, come noi pensiamo, *Chalara mycoderma* isolata da Cienkowski. Quest'ultima specie è tuttavia difficile, oggi, definirla in modo preciso dal punto di vista sistematico mancando di sufficienti elementi di giudizio.

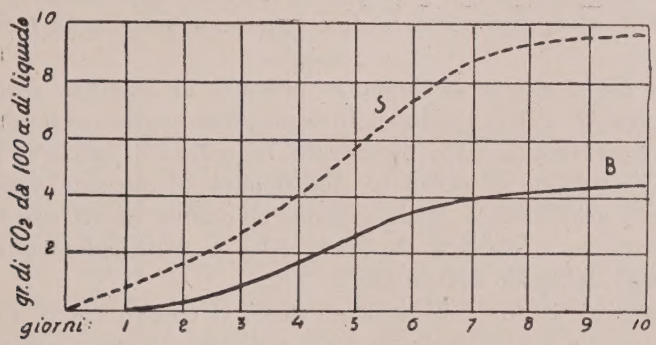

Fig. 1. – Aspetto micromorfologico di *Brettanomyces italicus*.

La specie da noi isolata trovasi più che ad ogni altra vicino a *Brett. bruxellensis*, var. *non-membranaefaciens* e a *Brett. lambicus*. Tuttavia da queste si discosta notevolmente per i caratteri micromorfologici, i caratteri colturali e quelli biochimici conforme anche esami comparativi effettuati su colture gentilmente rimesseci dal C.B.S. di Delft. Pertanto la manteniamo distinta con il nome di:

BRETTANOMYCES ITALICUS n. sp.

Cellulae plerumque ovoideae, globosae, rarius oblongae vel ogivali modo apicatae, cellularum gemmae catenas singulas irregulares, plurimasque pseudoramosas efficiunt. Pseudomycelii rudimenta interdum cum blastosporis minimis efformantur. Absunt asci.

In musto maltato fermentatio abest et odor insignitus fit; formatur depositum non pellicula. In medio minerali cum glucosio (fructosio, mannosio), saccharosio, maltosio pro fonte carbonis cultura crescere potest, sed non cum galactosio et lactosio.

Assimilatio nitratis potassii, sulfatis ammonici, asparaginae, peptonis.

In agaro maltato cellulae lente crescunt, celeriter moriuntur, sed longius vivere possunt cum carbonate calcico in agaro maltato aut cerevisiae glucosato.

Cultura in agaro maltato (tres septimanas–25° C.) in tubo, sub-lutea, laevis, paulum effusa, nitida, mollis. In agaro phaseoli et carotae cum saccharosio, cultura primum alba, nitens, mollis, effusa, deinde (tres septimanas–25° C.)

(6) G. KRUMBHOLZ e W. TAUSCHANOFF, « Zentr. f. Bakt. », II, vol. 88, p. 366, 1933.

lutea aut sub-lutea tipice cum marginibus tautum albo-griseis, nitida, paulum nervata.

Habitat: *in uvae fructibus.*

Come prima notavamo il rinvenimento di specie di *Brettanomyces* nelle uve e nel vino non appare, per quanto oggi è noto, molto frequente tanto che non sappiamo, al momento, quale importanza enologica si possa attribuire alla specie quì descritta. Ciò nonostante abbiamo voluto saggiare il suo comportamento di fronte ad alcuni costituenti del mosto, determinare la sua tolleranza all'alcool e, sopratutto, vedere come essa sostiene la fermentazione alcoolica.

Per la prima ricerca (sviluppo in presenza di quantità varie di acido tartarico e malico) si è proceduto coltivando *Brett. italicus* in un mezzo costituito da acqua 1000, fosfato bipotassico 1, solfato di calcio 1, peptone 1, glucosio 1, carbonato di calcio 10, addizionato di quantità varie di acido tartarico o di acido malico. Dopo 10 giorni di coltura risultò che la presenza di acido tartarico è tollerata, nei limiti delle quantità sperimentate, fino al 6 ‰ e quella dell'acido malico fino al 4 ‰.

Per saggiare la sua tolleranza all'alcool si coltivò invece in infuso di malto contenente alcool etilico in dosi progressivamente crescenti fino al 12.5 % in volume. Al 10° giorno si notò che lo sviluppo ebbe luogo anche in presenza del 12.5 % di alcool.

Finalmente il saggio di fermentazione fu eseguito (non disponendosi di mosto d'uva naturale) su di un mezzo costituito da acqua 1000, glucosio 200, acido tartarico 5, solfato di magnesio 0.1, fosfato bipotassico 0.75, fosfato ammonico 5, più piccole quantità di autolisato di lievito. L'esperienza fu condotta in matracci Erlenmeyer chiusi con valvola ad acido solforico determinando giornalmente, per 10 giorni, l'anidride carbonica sviluppantesi. In prove parallele, sempre al 10° giorno, fu dosato l'alcool per distillazione, ottenendosi in questo caso il 3.1 — 3.3 % di alcool in volume.

gr. di CO_2 su 100 di liquido prodotto da *Brettanomyces italicus* (c. 61) in comparazione con un ceppo di *Sacch. ellipsoideus.*

dopo giorni	*Brett. italicus*	*Sacch. ellipsoideus*
1	—	0.710
2	0.102	1.514
3	0.651	2.602
4	1.403	4.010
5	2.350	5.675
6	2.871	7.120
7	3.414	8.211
8	4.060	9.740
9	4.210	9.874
10	4.356	9.880

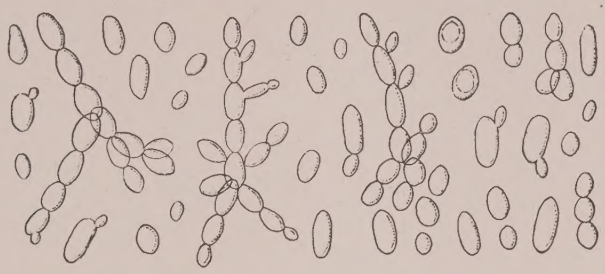

Fig. 2. – Quantità di CO_2 prodotta in 10 giorni da 100 cc. di liquido ad opera di *Brettanomyces italicus* (B) e *Sacch. ellipsoideus* (S).

Queste prove preliminari dimostrano che *Brettanomyces italicus* tollera una certa quantità di acidi (tartarico e malico) nel mezzo; tollera altresì una certa quantità di alcool etilico che forma, in soluzioni sintetiche presente zucchero (glucosio), fino al 3.1–3.3 % in volume.

Dato che le varie specie di *Brettanomyces* note sono apprezzate produttrici di aroma in alcune birre inglesi, intervenendo sopratutto nella fermentazione secondaria, resterà a vedere come questa specie (ed altre allo studio), sole od associate a *Saccharomyces ellipsoideus* si comporteranno nel mosto d'uva e quindi quale potrà essere la loro importanza enologica. Ciò sarà oggetto di ricerca durante la prossima campagna vinicola.

Roma, 1947. — Dott. G. Bardi, Tipografo dell'Accademia Nazionale dei Lincei.